

Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie
und Zellbiologie der Universität München

Vorstände:

Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher

Prof. Dr. E. M. Klingenberg

Prof. Dr. F. Miller

Prof. Dr. H. G. Zachau

NUKLEOTIDSEQUENZ EINER SATELLITEN - DNA DER RATTE

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dr. rer. nat. MICHAEL PECH

aus

Heidenheim

im Jahre ~~1983~~

1984



Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie
und Zellbiologie der Universität München

Vorstände:

Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher

Prof. Dr. E. M. Klingenberg

Prof. Dr. F. Miller

Prof. Dr. H. G. Zachau

NUKLEOTIDSEQUENZ EINER SATELLITEN - DNA DER RATTE

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dr. rer. nat. MICHAEL PECH

aus

Heidenheim

im Jahre 1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Hans Georg Zachau

Dekan: Professor Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Januar 1984

Die vorliegende Arbeit entstand im Jahre 1979 am
Institut für Physiologische Chemie, Physikalische
Biochemie und Zellbiologie der Universität München.

Herrn Professor Dr. H. G. Zachau, unter dessen
Anleitung diese Arbeit entstand, danke ich vielmals
für seine Unterstützung. Herrn Dr. T. Igo-Kemenes
gebührt mein Dank für seine vielen Anregungen
während der Durchführung der Arbeit.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise
veröffentlicht:

M. Pech, T. Igo-Kemenes und H. G. Zachau,
Nucl. Acids Res. 7, 417-432 (1979)

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Ergebnisse	4
2.1. Restriktionskarte und Sequenzierstrategie der Satelliten-DNA I	4
2.2. Isolierung und radioaktive Markierung von Fragmenten der Satelliten-DNA I	7
2.3. Sequenzierung von Fragmenten der Satelliten-DNA I	9
2.4. Methylierte Nukleotide in der Satelliten-DNA I	11
2.5. Die Sequenz der 370 bp Einheit der Satelliten-DNA I	13
3. Diskussion	15
3.1. Die ermittelte 370 bp Sequenz als eine Prototypsequenz der Satelliten-DNA I	15
3.2. Besondere Strukturelemente innerhalb der 370 bp Sequenz der Satelliten-DNA I	16
3.3. Einfluß der Methylierung der Satelliten-DNA I auf die Spaltung mit Restriktionsnukleasen.	18

3.4.	Vergleich der Satelliten-DNA I - Sequenz der Ratte mit Sequenzen von Satelliten-DNAs anderer Organismen	19
3.5.	Evolution der Satelliten-DNA I	21
4.	Materialien und Methoden	23
4.1.	Restriktionsnukleasen und andere Enzyme.	23
4.2.	Isolierung der Satelliten-DNA I und der pBR 322 - DNA	23
4.3.	Gelelektrophoresen	24
4.4.	Sequenzierung	24
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	26
6.	Literaturverzeichnis	28
7.	Abkürzungsverzeichnis	32

Lebenslauf

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Das Genom fast aller Eukaryonten enthält DNA-Sequenzen, die in zahlreichen Kopien vorliegen. Aufgrund ihrer Renaturierungsgeschwindigkeit lassen sich hochrepetitive und mittelrepetitive DNA-Komponenten von solchen DNA-Sequenzen unterscheiden, die nur einmal oder wenige Male im Genom vorkommen (3). Hochrepetitive DNA besteht aus Sequenzen, die mehr als einige hunderttausendmal wiederholt werden und blockweise im Genom vorliegen. Sie läßt sich oft aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte durch Gradientenzentrifugation abtrennen und wird dann als Satelliten-DNA bezeichnet (17). Es hat sich aber eingebürgert, jede hochrepetitive DNA als Satelliten-DNA zu bezeichnen.

Über Funktion und Entstehungsweise der Satelliten-DNAs existieren mehrere Hypothesen. Eine Hypothese betont ihre Bedeutung für den Chromosomenaufbau, wie z. B. für die Rigidität des Zentromerbereiches (43). Sie soll auch zur Erkennung homologer Chromosomen bei der Chromosomenpaarung in der Meiose beitragen (43). Der Satelliten-DNA wurden ferner spezifische Funktionen bei Neukombinationen im Genom (13) und ein Einfluß auf Lage und Ausmaß von Rekombinationsereignissen (13) zugeschrieben. Die Aufklärung der Primärstruktur der Satelliten-DNA kann dazu beitragen, Erkenntnisse über ihre Funktion zu gewinnen oder Sequenzelemente zu finden, die für ihre Verbreitung im Genom als "selfish DNA" verantwortlich sein könnten (s. Zusammenfassung unter Ref. 5).



Für die Ermittlung der Primärstruktur ist eine Reinigung der Satelliten-DNA notwendig. Dazu können entweder die Satelliten-DNA Sequenzen kloniert werden oder man kann versuchen, die Satelliten-DNA so stark anzureichern, daß eine direkte Sequenzierung der DNA-Fragmente möglich ist. Die Anreicherung kann entweder über CsCl-Gradientenzentrifugation erfolgen oder mit Hilfe von Techniken, die nach Spaltung der DNA mit Restriktionsnukleasen eine Abtrennung der Satelliten-DNA Fragmente ermöglichen. Restriktionsnukleasen zerlegen eukaryontische DNA sequenzspezifisch in viele Bruchstücke. Nach Auftrennung der entstehenden Fragmente durch Gelelektrophorese erhält man - wegen der großen Anzahl an Fragmenten unterschiedlicher Größe - eine kontinuierliche Verteilung der DNA-Bruchstücke. Banden in dieser Verteilung werden durch Fragmente gebildet, die aus hochrepetitiven Sequenzen stammen. Eine unterschiedliche Verteilung der Restriktionsspaltstellen zwischen der hochrepetitiven und der übrigen DNA kann zur Anreicherung der hochrepetitiven Komponente benützt werden (2).

Da bisher durch CsCl-Gradientenzentrifugation keine Satelliten-DNA aus dem Genom der Ratte isoliert werden konnte, wurde versucht, ob eine Anreicherung nach Spaltung mit Restriktionsnukleasen über die Sequenzierung dieser DNA ausreicht. Die Isolierung der hochrepetitiven Komponente, die als Satelliten-DNA I der Ratte bezeichnet werden soll, war bereits von T. Igo-Kemenes ausgearbeitet worden (16, 27). Ihre Nukleotidsequenz war speziell im Zusammenhang mit Strukturuntersuchungen am Heterochromatin von Interesse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, nicht klonierte Fragmente aus Satelliten-DNA I der Ratte zu sequenzieren. Hierfür mußten weitere Restriktionsspaltstellen in der repetitiven Einheit der Satelliten-DNA bestimmt werden. Aus der ermittelten Sequenz sollten Rückschlüsse auf die Entstehung der Satelliten-DNA gezogen werden und sie sollte mit Satelliten-DNA Sequenzen anderer Organismen verglichen werden.

2. ERGEBNISSE

Aufgrund von Untersuchungen zur Renaturierungskinetik wurde im Ratten-Genom ein Anteil von 8-10 % an hochrepetitiver DNA gefunden (1). Bisher konnte aber durch CsCl-Gradientenzentrifugation keine Satelliten-DNA der Ratte isoliert werden (23).

Durch Spaltung von Ratten-DNA mit Sau 3A I (GATC, 37) gelang es jedoch T. Igo-Kemenes die Satelliten-DNA I als eine hochmolekulare DNA-Fraktion von der übrigen, niedermolekularen, gespaltenen DNA durch Gelfiltration abzutrennen (27). Diese Fraktion (s. 4.2.) wurde als Ausgangsmaterial für die weiteren Analysen benutzt. Ihr Anteil an der gesamten Genom-DNA beträgt ungefähr 1-3 % (27).

2.1. Restriktionskarte und Sequenzierstrategie der Satelliten-DNA I

Es war bereits bekannt, daß Spaltung mit Eco RI die Satelliten-DNA I in Fragmente zerlegt, deren Länge ein Vielfaches von etwa 95 bp beträgt (16 und Abb. 1), während Hind III (16) oder Hae III (8) ein Bandenmuster erzeugen, das mit einer repetitiven Einheit von etwa 380 bp in Einklang steht (9). Ein Beispiel für Spaltungen der Satelliten-DNA I mit Eco RI und Hinf I ist in Abb. 1 wiedergegeben.

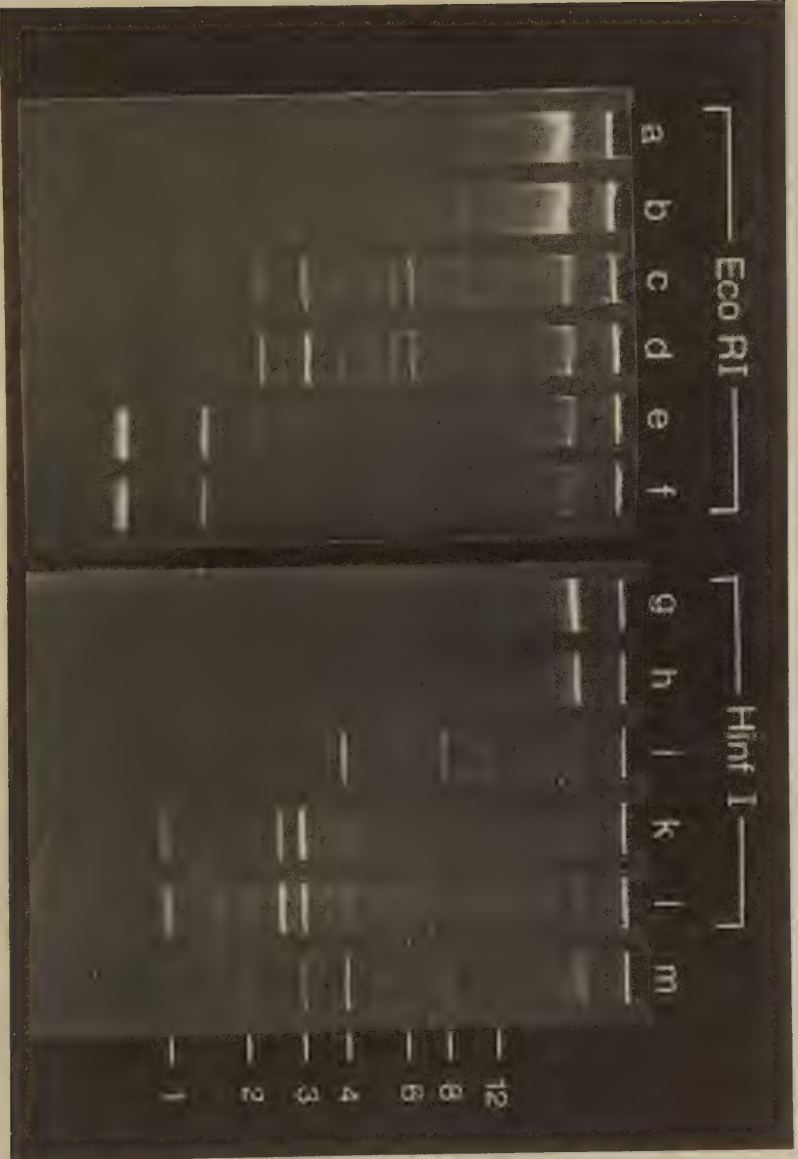


Abb. 1: Legende siehe nächste Seite

Abb. 1: Spaltung von Satelliten-DNA I mit Eco RI und Hinf I

Jeweils 1,25 µg Satelliten-DNA I wurden für 1 h bei 37° C in einem Volumen von 25 µl mit 16, 40, 80, 160, 800 und 8000 Einheiten/ml Eco RI inkubiert (a-f). Die Bahnen g-l enthalten unter den gleichen Bedingungen gespaltene Satelliten-DNA nach Inkubation mit 3, 6, 12 und 120 Einheiten/ml Hinf I. Die DNA in Bahn 1 wurde für 5 h mit 240 Einheiten/ml in Hinf I inkubiert. Alle Proben wurden auf einem 1,5 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Bahn m enthält die gleiche Probe wie Bahn d. Die Zahlen bezeichnen die Vielfachen einer 92/93 bp Einheit.

Die Hind III - und Hae III - Spaltstellen wurden für die Sequenzierung der entsprechenden Monomer-Fragmente benützt. Im Laufe der Sequenzierung konnten die Positionen der Hinf I - Spaltstellen bestimmt werden. Zusätzlich wurden drei Spaltstellen für Hph I gefunden, die eine Sequenzierung über die Hind III bzw. Hae III - Spaltstelle hinweg ermöglichen. Aufgrund der Restriktionsspaltungen und Sequenzierungsergebnisse konnte eine genaue Restriktionskarte der repetitiven Einheit der Satelliten-DNA I erstellt werden (Abb. 2). Die repetitive Einheit weist eine Länge von 370 bp auf. In Abb. 2 ist gleichzeitig die Sequenzierungsstrategie an der 370 bp Einheit demonstriert.

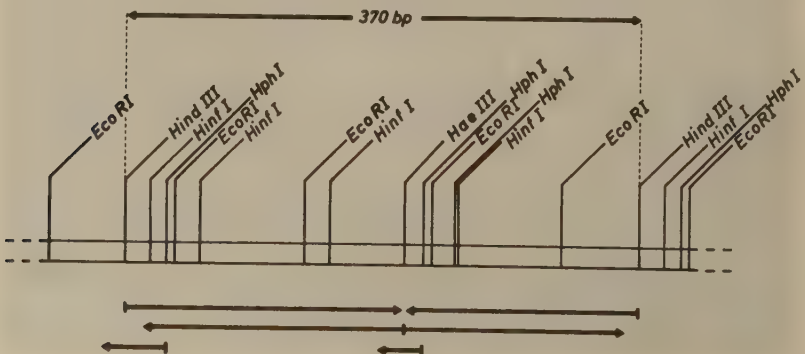


Abb. 2: Legende siehe nächste Seite

Abb. 2: Restriktionskarte und Sequenzierstrategie einer repetitiven Einheit (370 bp) der Satelliten-DNA I

Die Restriktionsspaltstellen innerhalb einer repetitiven Einheit (370 bp) sind angegeben. Ihre genaue Position ergibt sich aus den Ergebnissen der Sequenzierung. Die Pfeile (5' → 3') kennzeichnen die Richtung und die Länge der sequenzierten DNA-Stränge.

2.2. Isolierung und radioaktive Markierung von Fragmenten der Satelliten-DNA I

Die Satelliten-DNA I wurde nach Spaltung mit einer Restriktionsnuklease mit Hilfe von alkalischer Phosphatase (4.4.) am 5' Ende dephosphoryliert. Die Fragmente wurden dann durch Gelelektrophorese in 4 -5 %-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt (4.3.) und durch Ausschneiden der sie enthaltenden Gelstücke isoliert (4.3.). In Abb. 3 ist als Beispiel die Auftrennung eines präparativen Spaltungsgemisches der Satelliten-DNA I mit Hph I dargestellt.

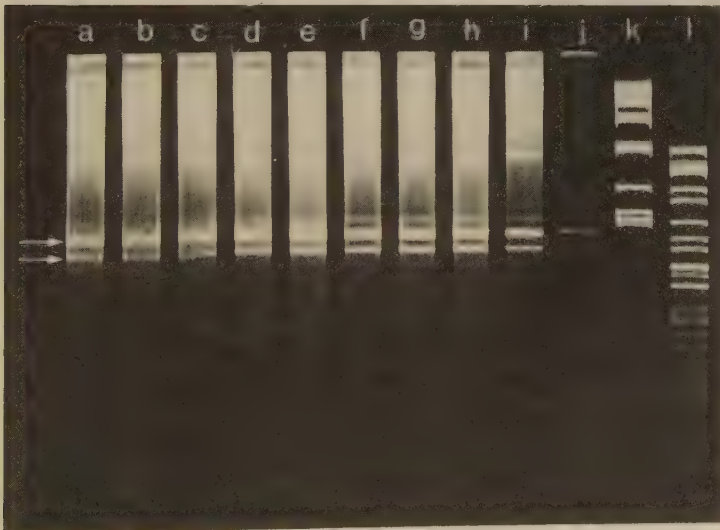


Abb. 3: Legende siehe nächste Seite

Abb. 3: Präparative Isolierung von Hph I - Fragmenten der Satelliten-DNA I

Jeweils 10 µg mit Hph I gespaltene Satelliten-DNA I (4.1.) wurde auf einem 5 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (a-i, 4.3.). Bahn j enthält nur 1 µg dieser gespaltenen DNA. Als Größenstandard wurden in Bahn k mit Hph I, und in Bahn l mit Hha I gespaltene pBR 322 - DNA aufgetragen. Die durch Pfeile gekennzeichneten Hph I - Fragmente mit einer Länge von 185 bzw. 162 bp wurden durch Ausschneiden der entsprechenden Gelstücke isoliert (4.3.).

Nach Elution der Fragmente (4.3.) und Markierung mit ^{32}P mit Hilfe von Polynukleotidkinase (4.4.) wurde mit einer zweiten Restriktionsnuklease nachgespalten, um Fragmente zu erhalten, die nur an einem 5' Ende markiert sind (s. Sequenzierstrategie in Abb. 2). Die markierten Fragmente wurden erneut auf 5-8 %-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt (4.3.) und isoliert.

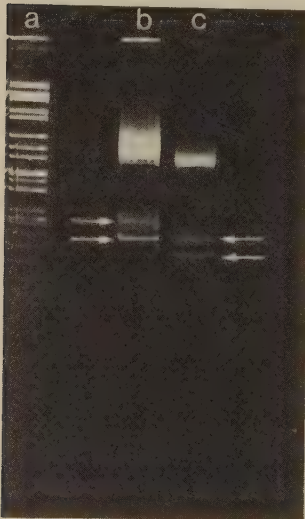


Abb. 4: Nachspaltung der markierten Hph I - Fragmente

Die Hph I - Fragmente aus der präparativen Gelelektrophorese (Abb. 3) wurden nach Markierung mit ^{32}P (4.4.) und Nachspaltung mit Eco RI auf einem 8 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bahn a enthält die mit Hha I gespaltene pBR 322 - DNA als Größenstandard. Die Eco RI - Spaltungen des 185 bp großen (b) und 162 bp großen (c) Hph I - Fragmentes waren in diesem Fall unvollständig. Die durch Pfeile gekennzeichneten Fragmente der Größe von 92, 86 und 72 bp wurden isoliert (4.3.).

In Abb. 4 ist die Nachspaltung der markierten Hph I - Fragmente mit Eco RI dargestellt. Die markierten, isolierten Fragmente konnten jetzt den Sequenzierreaktionen unterworfen werden.

2.3. Sequenzierung von Fragmenten der Satelliten-DNA I

Die Sequenzierreaktionen wurden nach der Methode von Maxam und Gilbert (21) durchgeführt (s. 4.4.). Nach der Auftrennung der Reaktionsprodukte auf 20 %-igen oder 8 %-igen Polyacrylamidgelen (s. 4.4.) und Autoradiographie der Sequenziergele konnte die Sequenz einwandfrei abgelesen werden. Ein Beispiel für ein Autoradiogramm eines Sequenziergels ist in Abb. 5 wiedergegeben. An definierten Positionen im Sequenziergel zeigten sich zusätzlich Banden geringerer Intensität, die auf eine Sequenzheterogenität an diesen Positionen hindeuten. Das ist ein Hinweis darauf, daß ein kleiner Anteil der repetitiven Einheiten der Satelliten-DNA an diesen definierten Positionen mit einem anderen Nukleotid besetzt ist. Aufgrund der eingeschränkten Basenspezifität der chemischen Spaltreaktionen können kleinere Anteile von T an der Position eines C oder geringe Mengen von A an der Position eines G nur schwer entdeckt werden. Diese abweichenden Nukleotide wurden nur berücksichtigt, wenn in den Sequenziergelen beider DNA - Stränge die entsprechenden Banden geringerer Intensität auftraten und sie komplementäre Nukleotide repräsentierten. Derartige Abweichungen wurden in acht Positionen der 370 bp Einheit gefunden. Dies stellt aufgrund der aufgeführten Einschränkungen eine Mindestanzahl für derartig definierte teilweise Basenaustausche dar.

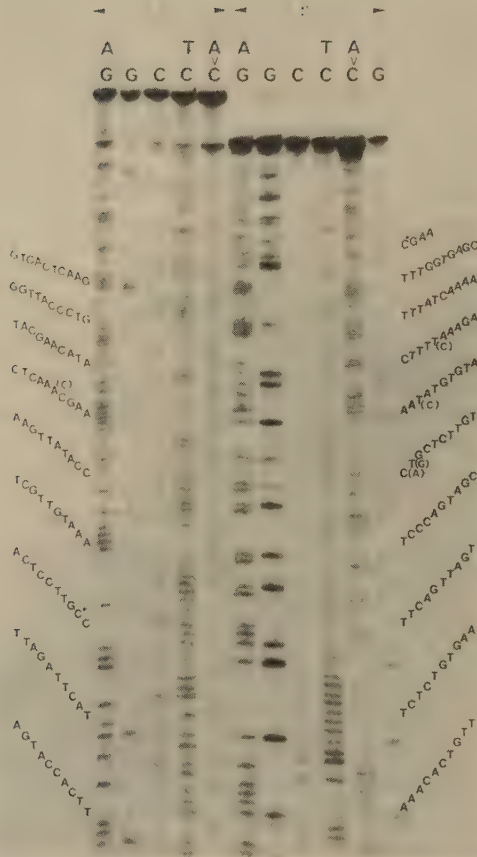


Abb. 5: Autoradiogramm eines Sequenziererges von Hind III - Fragmenten der Satelliten-DNA I

Das isolierte Hind III - Monomerfragment der Satelliten-DNA (4.3.) wurde mit ^{32}P markiert und mit Hae III nachgespalten (4.1.).

Die beiden isolierten (4.3.) Fragmente (a, b) wurden nach den Sequenzierreaktionen (4.4.) auf einem 8 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Positionen mit einer Mischung von C und m^5C in der Sequenz des großen (a) und kleinen (b) Hind III - Hae III- Fragmentes sind mit C* gekennzeichnet. Die Nukleotidsymbole in Klammern bezeichnen die Nukleotide, die an den entsprechenden Positionen nur in einem geringen Anteil vorkommen.

2.4. Methylierte Nukleotide in der Satelliten-DNA I

Eukaryontische DNA ist teilweise modifiziert. 5 - Methylcytosin (m^5C oder C*) findet man in der DNA aus tierischen Zellen fast nur in der Sequenz C*G (7,43). Kommt C*G in einer Basenabfolge vor, so erkennt man das an einer Lücke im Bandenmuster der Autoradiogramme von Sequenziergelen (24). Sind nicht alle Fragmente an dieser Position methyliert, führt das nur zu einer Abschwächung der Schwärzung der C und C+T Banden im Autoradiogramm des Sequenziergeles. Diese Situation wurde für die Satelliten-DNA I gefunden, wie die Abbildungen 5 und 6 demonstrieren. Im komplementären Strang trat immer ein G an der Position eines m^5C auf. Alle zehn CpG Paare in der Sequenz der Satelliten-DNA I waren symmetrisch methyliert. Methylierung wurde nur in dieser Sequenz beobachtet. Die Lokalisation von m^5C innerhalb der Erkennungssequenz verschiedener Restriktionsnukleasen konnte mit der Geschwindigkeit der Restriktionsspaltung korreliert werden (3.3.).

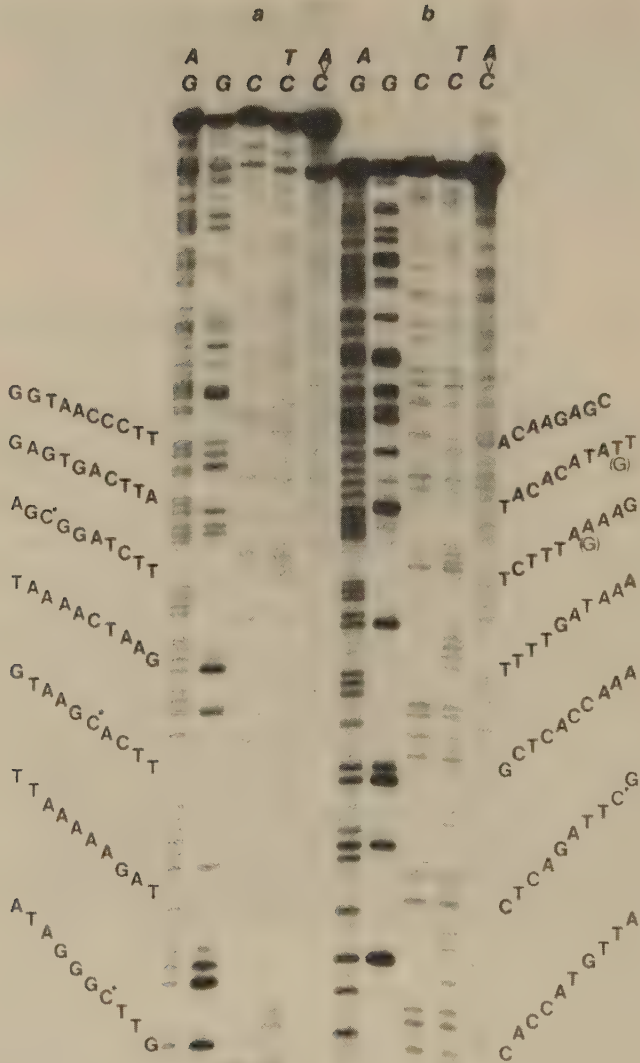


Abb. 6: Autoradiogramm eines Sequenziergeles von Hae III-Fragmenten der Satelliten-DNA I
Das isolierte Hae III - Monomerfragment der Satelliten-DNA I

wurde mit ^{32}P markiert und mit Hind III nachgespalten (4.1.).
Die Sequenzierung und die Beschriftung des Autoradiogramms
entspricht der Beschreibung in Abb. 5.
a: 201 bp Hae III- Hind III - Fragment;
b: 169 bp Hae III- Hind III - Fragment.

2.5. Die Sequenz der 370 bp Einheit der
 Satelliten-DNA I

Die Sequenz der Satelliten-DNA I wurde vollständig ermittelt.
Es ergibt sich der in Abb. 7 dargestellte Aufbau der
370 bp Einheiten: Die 370 bp Einheit kann in zwei 92 bp und
zwei 93 bp Untereinheiten unterteilt werden. Diese 92/93 bp
Einheiten unterscheiden sich untereinander in 27 - 38 %
ihrer Sequenz. Aus beiden 92 bp und den beiden 93 bp Einheiten
läßt sich eine Prototypsequenz ermitteln, die die Basenab-
folge der häufigsten Basen in jeder Position der 93 bp Einheit
darstellt. Die Gesamtdivergenz aller 92/93 bp Einheiten von
dieser 93 bp Prototypsequenz beträgt 19 %. In allen vier Ein-
heiten finden sich an homologen Positionen nur zwei größere
Basenabfolgen, die in ihrer Sequenz identisch sind: die Se-
quenz TGGGAAC und die Erkennungssequenz für Eco RI GAATTC.
Die 92/93 bp Einheiten sind nicht aus eindeutig erkennbaren
kleineren Sequenzmotiven aufgebaut.

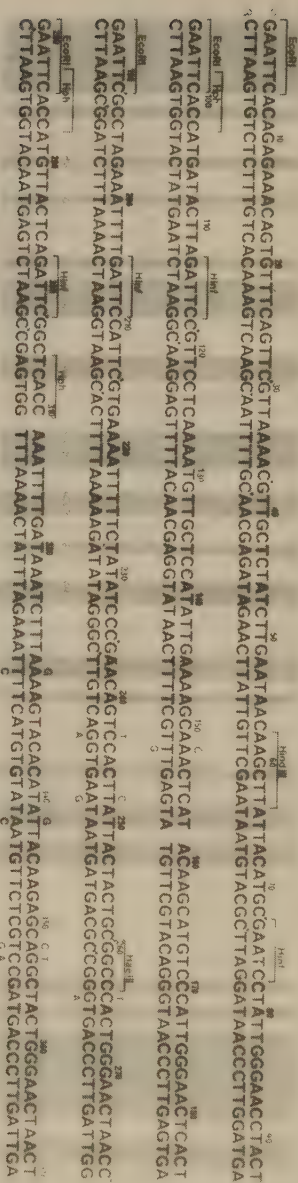


Abb. 7: Sequenz der 370 bp Einheit der Satelliten-DNA I

Nukleotide, die in identischen Positionen in allen vier 92/93 bp Einheiten vorkommen, sind durch Schattlierung hervorgehoben. Nukleotide, die nur in einem geringeren Anteil der 370 bp Einheiten vorkommen, sind in kleiner Schrift über die entsprechenden Nukleotide gesetzt. Spaltstellen für Restriktionsnukleasen sind mit eckigen Klammern gekennzeichnet. An zwei Positionen wurde in die Darstellung der Sequenz eine Lücke eingeführt, um die beste Homologie zwischen den 92/93 bp Einheiten zu erreichen.

3.

DISKUSSION

3.1. Die ermittelte 370 bp Sequenz als eine
Prototypsequenz der Satelliten-DNA I

In dieser Arbeit wurde die Sequenz einer Satelliten-DNA der Ratte aus nicht klonierten Fragmenten ermittelt. Durch die Anreicherungsprozedur und die anschließenden Restriktionsspaltungen wurde nur eine Teilmenge der gesamten Satelliten-DNA I der Sequenzanalyse unterworfen. Durch die Größenselektion der Gelfiltration wurden alle Fragmente, deren Größe unter ungefähr 10000 bp liegt, abgetrennt. Deshalb wurde der Anteil der Satelliten-DNA, der innerhalb von ungefähr 10000 bp eine Sau 3A I - Spaltstelle enthält, verworfen (4.2.). Innerhalb der ermittelten Sequenz findet man 20 Positionen, die durch den Austausch eines einzigen Basenpaares in Sau 3A I - Erkennungssequenzen umgewandelt werden können. Aufgrund des Bandenmusters nach Hae III - Spaltung wurde entsprechend der Berechnungsformel nach E. M. Southern (36) eine Divergenz von 3 % für diese Satelliten-DNA bestimmt. (27). Unter der Annahme, daß diese Divergenz für die gesamte repetitive Einheit gilt, muß in mindestens $(0,97)^3(0,01) \times 20 \times 100 \% = 18 \%$ der 370 bp Einheiten eine Sau 3A I - Spaltstelle vorhanden sein.

Durch die Sequenzierstrategie wurden wiederum nur die repetitiven Einheiten ausgewählt, die sowohl eine Hae III - als auch eine Hind III - Spaltstelle enthalten. Berechnungen, die in analoger Weise wie für die möglichen Sau 3A I - Erkennungsstellen durchgeführt werden, ergeben, daß der

Anteil der Satelliten-DNA I - Sequenz, der durch die ermittelte Sequenz repräsentiert wird, höchstens 56 % beträgt. Zusätzlich sollte bedacht werden, daß es sich bei der ermittelten Sequenz um eine Prototypsequenz für die 370 bp Einheit handelt, d.h. um die Abfolge der Basen, die jeweils in einer bestimmten Position der Einheit am häufigsten vertreten sind. Die Wahrscheinlichkeit, tatsächlich eine 370 bp Einheit zu finden, deren Sequenz mit dieser Prototypsequenz identisch ist, ist nach der Formel $(0,97)^{370}$ nur etwa 10^{-5} . Das bedeutet, daß nur eine von 10^5 370 bp Einheiten genau die in Abb. 7 dargestellte Sequenz aufweisen muß, obwohl ihr alle sehr ähnlich sind.

3.2. Besondere Strukturelemente innerhalb der 370 bp Sequenz der Satelliten-DNA I

Aus der ermittelten Sequenz läßt sich der G+C - Gehalt der Satelliten-DNA I errechnen. Er beträgt 38,1 % und damit wird der Wert von 68 %, der von H. Busch und Mitarbeitern (10) für das Hind III - Monomerfragment ermittelt wurde, korrigiert. Der Wert von 38,1 % erklärt auch die Schwierigkeiten beim Versuch, Satelliten-DNA der Ratte durch CsCl - Gradientenzentrifugation von der übrigen DNA mit einem G+C - Gehalt von etwa 42 % (Mittelwert der Daten in Ref. 34) abzutrennen.

Der CpG - Gehalt in Satelliten-DNA I errechnet sich zu 2,7 % und ist damit dem CpG - Anteil von 2,6 % in der Satelliten-DNA der Maus (29) sehr ähnlich. Er ist deutlich

Durch Analyse der ermittelten Sequenzen mit Hilfe eines elektronischen Rechners und eines von U. Hänggi entwickelten Programms wurden zahlreiche Symmetrieelemente in der 370 bp Sequenz gefunden (Abb. 8). 150 bp sind insgesamt an Symmetrieelementen mit formaler zweiachsiger Rotations-symmetrie beteiligt, die jeweils länger als 5 bp sind. Über die Bedeutung dieser zahlreichen Symmetrieelemente können nur unsichere Hypothesen erstellt werden. So erscheint ihre Beteiligung als spezifische Erkennungsstellen bei Rekombinationsprozessen möglich (42).

3.3. Einfluß der Methylierung der Satelliten-DNA I auf die Spaltung mit Restriktionsnukleasen

5 - Methylcytosin innerhalb einer Erkennungssequenz einer Restriktionsnuklease beeinflusst die Spaltung dieser DNA-Sequenz durch die entsprechende Nuklease. Daß Hae III die Sequenz $\begin{matrix} G & G & C & C^* \\ C^* & C & G & G \end{matrix}$ im Gegensatz zur Sequenz $\begin{matrix} G & G & C^* & C \\ C & C^* & G & G \end{matrix}$ spaltet, war schon länger bekannt (19). Auch bei der Satelliten-DNA I der Ratte läßt sich die Sequenz $\begin{pmatrix} C^* \\ G \end{pmatrix} G & G & C & C & C$ (Position 260 - 264) durch Hae III spalten, während sie durch Sau 96 I (GGNCC) nur sehr langsam gespalten wird. Eine ähnliche Situation wurde in der 1,706 Kalbs-thymus-Satelliten-DNA gefunden (26). Zwei von vier Eco RI - Erkennungssequenzen und zwei von vier Erkennungssequenzen für Hinf I enthalten 5 - Methylcytosin nur in einem DNA - Strang am Rande der Spaltsequenz. Diese Methylierung reicht aus, um die Spaltung dieser Sequenzen durch Eco RI bzw. Hinf I zu verlangsamen, wie T. Igo-Kemenes durch Restriktionsspaltungen nachweisen konnte, in denen Enzymkonzentrationen und Inkubationszeiten variiert wurden. Die unter-

schiedliche Spaltgeschwindigkeit methylierter und nicht methylierter Sequenzen führt zu ungleichen Intensitätsverteilungen der Fragmente nach ihrer Auftrennung in Agarosegelen, wie das auch in Abb. 1 zu sehen ist. Nicht nur Methylierung innerhalb und außerhalb der Erkennungssequenz sondern auch andere Sequenzunterschiede beeinflussen die Spaltgeschwindigkeit, da z.B. durch Eco RI die Positionen 1 - 6 schneller als die Positionen 94 - 99 (Abb. 7) gespalten werden.

3.4. Vergleich der Satelliten-DNA I - Sequenz der Ratte mit Sequenzen von Satelliten-DNAs anderer Organismen

Beim Vergleich der Satelliten-DNA I - Sequenz der Ratte mit der unvollständigen Sequenz der Maus - Satelliten-DNA (31) ergibt sich eine Übereinstimmung beider Sequenzen in 48 % der homologen Positionen, wenn man die unsicheren Positionen in der Satelliten-DNA - Sequenz der Maus (Punkte in Abb. 9) nicht in die Berechnung mit einbezieht. Auch die kürzlich ermittelte komplette Sequenz der Satelliten-DNA der Maus (14) ändert nichts an dem bestimmten Homologieausmaß. Dieses Ergebnis erscheint wegen des nahen Verwandtschaftsgrades beider Arten verständlich. Zusätzlich findet man aber auch noch begrenzte Homologien zu Teilsequenzen der Satelliten-DNA aus *Drosophila melanogaster*, aus dem Rind, der grünen Meerkatze und aus menschlicher DNA (Abb. 9).

```

I  --CAAATTTTGATTA--
II ATGGCGAGAAACTGCAAAACATGAAATCAG...CACTGACGACTGAAATGACGAA...AAACCTGAA
III --CAAATTTTGATAAATCTTTAAAGTACACATATTACAAGACGAGGCTACTGGGAACCTAACTGAATTCACAGAGAAACAGTGTTCAGTTCGTTA--
IV      GATCAGCTGACTGATCATGCACT
V      CACAGAGCAGACTTGAAACACTCTTTTT--
VI      CACAGAGTTACATCTTCCCTTCAAGAA--

```

Abb. 9: Sequenzvergleich der Satelliten-DNA I mit anderen Satelliten-DNAs

Satelliten-DNA - Sequenzen von *Drosophila melanogaster* (I), Maus (II), Rind (IV), Mensch (V) und Affe (VI) wurden mit der Satelliten-DNA I - Sequenz (III, Position 310 - 34) verglichen. Die Teilsequenzen wurden so angeordnet, daß möglichst große Homologien erreicht werden, die durch Schattierungen gekennzeichnet sind. Es sind die Teilsequenz der 1,688 *Drosophila melanogaster* Satelliten-DNA (4), die Prototypsequenz der Sau - Segmente der 1,706 Satelliten-DNA aus Kalbsthymus (26), die Teilsequenz einer menschlichen Satelliten-DNA (Positionen 61 - 88 in Ref. 20) und der *C. aethiops* α - Satelliten-DNA (Positionen 39 - 66 in Ref. 28) aufgeführt.

Die beobachteten Homologien reichen aber nicht für eine Interpretation im Sinne der "Library" - Hypothese (8) aus. Nach dieser Hypothese sollen aus einer Vielzahl von Sequenzen, die in allen Arten einen Grundstock für repetitive Sequenzen bilden, in einzelnen Arten bestimmte Sequenzen in verschiedenem Ausmaße amplifiziert worden sein. Man kann auch eine andere Interpretation nicht ausschließen, wenn man postuliert,

daß im Sinne einer konvergenten Evolution bestimmte Sequenz-motive aufgrund der Erkennungssequenzen funktionell wichtiger Enzyme bevorzugt amplifiziert werden.

3.5. Evolution der Satelliten-DNA I

Die Ergebnisse der Sequenzierung und zusätzliche Ergebnisse aus Restriktionsnukleasespaltungen können in einem Evolutionsmodell der Satelliten-DNA I zusammengefaßt werden.

Aufgrund der Homologien zwischen den 92/93 bp Einheiten kann man annehmen, daß eine 93 bp Sequenz den Ausgangspunkt für die Entstehung dieser Satelliten-DNA bildete. Nach und während der Amplifikation dieser 93 bp Einheiten, die durch ungleiche Crossover - Ereignisse (32) erfolgt sein könnte, veränderte sich die Sequenz durch die Deletionen und Mutationen. Diese Mutationen führten auch irgendwo in der Abfolge der 93 bp Einheiten zur Entstehung der Hind III - und Hae III - Spaltstellen. In einem weiteren Evolutionsschritt wurde eine 370 bp Sequenz amplifiziert. Bei der Ausbreitung dieser 370 bp Sequenz wurden einzelne Kopien durch Mutationsereignisse verändert und in unterschiedlichem Ausmaße amplifiziert. So entstanden "Subpopulationen" aus 370 bp Einheiten, die sich in allen Kopien in wenigen definierten Positionen voneinander unterscheiden. Dafür spricht auch die Beobachtung der Banden geringerer Intensität in den Sequenzgelen der Hind III - und Hae III - Fragmente. Sie stimmt auch mit den Ergebnissen von

T. Igo-Kemenes überein, daß ungefähr 15 % der Satelliten-DNA I bei Spaltung mit Eco RI, Hae III oder Hind III nicht zu niedermolekularen Fragmenten der entsprechenden Multimerreihe abgebaut werden konnte, wobei jedoch das nicht abgebaute Material mit einer weiteren Restriktionsnuklease gespalten werden konnte. Diese Segmentalisierung wurde zuerst in Maus - Satelliten-DNA beobachtet (15).

Die Evolution der Satelliten-DNA I begann somit wahrscheinlich mit einer 93 bp Einheit, die nach Amplifikation und Mutationsereignissen zur 370 bp Einheit wurde. Diese ergab nach erneuter Amplifikation noch größere repetitive Einheiten und Segmente.

4.

MATERIALIEN UND METHODEN

4.1.

Restriktionsnukleasen und andere Enzyme

Eco RI und Hind III wurden wie in der Ref. 12 bzw. 6 beschrieben durch T. Igo-Kemenes isoliert und zur Verfügung gestellt. Nach Ref. 38 gereinigtes Sau 3A I und Hinf I waren ein Geschenk von R. E. Streeck. Sau 96 I wurde nach Ref. 39 von W. Hörz präpariert. Hph I war ein Produkt der Firma New England Biolabs Inc., Beverly MA. Die Spaltbedingungen mit diesen Restriktionsnukleasen entsprachen den Bedingungen in den Referenzen 16 und 37.

Glycerinaldehyd - 3 - phosphat - Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, 3 - Phosphoglycerat - Kinase aus Hefe, Polynukleotid - Kinase aus T4 - infizierten Escherichia coli und alkalische Phosphatase aus Kälberdarm wurden von der Firma Boehringer, Mannheim gekauft.

4.2.

Isolierung der Satelliten-DNA I und der pBR 322 - DNA

Ratten - Satelliten-DNA I wurde durch T. Igo-Kemenes isoliert und zur Verfügung gestellt. Die Anreicherung erfolgte aus isolierten Rattenleber-Kernen nach Behandlung mit Proteinase K. Nach Spaltung mit Sau 3A I wurde eine hochmolekulare Fraktion durch Gelfiltration über Sepharose 2B - Säulen von der übrigen DNA abgetrennt. Eine Fraktion, die 30 - 40 % Satelliten-DNA I enthielt, wurde für die Sequenzanalyse verwendet. Einzelheiten sind in Ref. 27 beschrieben. Plasmid pBR 322 - DNA wurde nach Ref. 40 isoliert.

4.3.

Gelelektrophoresen

Agarose - Gelelektrophoresen wurden nach Referenz 16 durchgeführt. Elektrophoresen in 4 - 8 %-igen Polyacrylamidgelen (1/20 N, N' - Methylenbisacrylamid, Tris - Boratpuffer entsprechend Ref. 25) wurden, wie in Ref. 37 angegeben, durchgeführt.

DNA - Fragmente aus Polyacrylamidgelen wurden durch Ausschneiden der mit 1 µg/ml Ethidiumbromidlösung angefärbten Gelstücke isoliert. Nach mechanischer Zerkleinerung der Gelstücke wurde aus der Suspension die DNA durch Elution mit 1 M NaCl in 2 ml - Einwegspritzen mit eingelegtem Whatman 3 MM Papier gewonnen. Zur Reinigung wurde das Eluat im gleichen Arbeitsgang durch eine zweite 2 ml - Einwegspritze mit eingelegtem Whatman 3 MM Papier getropft. Nach zweimaliger Fällung mit 2,5 Volumenteilen 96 % Äthanol wurde die DNA zweimal mit 80 % Äthanol gewaschen und lyophilisiert.

4.4.

Sequenzierung

Die Herstellung von $\{\gamma\text{-}^{32}\text{P}\}$ ATP erfolgte nach Ref. 21 unter Benutzung der in 4.1. aufgeführten Enzyme. ^{32}P wurde von NEN Chemicals, GmbH, Dreieich, bezogen.

Nach Inkubation der Restriktionsspaltungen mit alkalischer Phosphatase (60 min; 37° C in 50 mM Tris pH 8,0; 3 Einheiten für ungefähr 5 µg DNA) wurde einmal mit Phenol extrahiert

und die wässrige Phase dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Nach Fällung mit 2,5 Volumenteilen 96 % Äthanol und Gel-elektrophorese wurden die entsprechenden Fragmente, wie unter 4.3. angegeben, isoliert und ihre 5' OH - Enden mit T4 - Polynukleotid - Kinase und $\{\gamma\text{-}^{32}\text{P}\}$ ATP entsprechend der Ref. 22 radioaktiv markiert. Nach Inkubation mit einer zweiten Restriktionsnuklease wurden die an einem 5' Ende markierten Fragmente wie unter 4.3. angegeben isoliert und den Abbaureaktionen nach den Vorschriften von Maxam und Gilbert (21, 22) unterworfen.

Die Produkte von fünf verschiedenen Reaktionen (spezifisch für A+G, G, C, C+T und A+C) wurden auf 8 oder 20 %-igen Polyacrylamidgelen (in 8,3 M Harnstoff; Abmessungen $0,25 \times 200 \times 400$ mm) aufgetrennt. Die für Purine spezifische Reaktion entstammt der Arbeit von C. P. Gray et al. (11). Die Piperidin - Inkubation erfolgte in zugeschnittenen, silikonisierten Kapillaren ($100 \mu\text{l}$) der Firma Brand, Wertheim/Main. Zur Autoradiographie der Sequenzgele bei -70°C wurde der Kodak-Film X-Omat XR5 und bei Bedarf Verstärkerfolien (Cawo SE 6, Firma Cawo, Schrobenhausen) verwendet. In einigen Fällen wurden die Sequenzgele nach Exposition langsam bei -20°C und 4°C aufgetaut und nach erneutem Auflegen der zweiten, ausgeschnittenen Glasplatte wieder elektrophorisiert und autoradiographiert.

5.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die Satelliten-DNA I der Ratte, die 1 - 3 % des gesamten Ratten-Genoms ausmacht, wurde durch Spaltung mit Restriktionsnukleasen und Sequenzierung der Restriktionsfragmente charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß sich auch mit nicht klonierten Fragmenten eine eindeutige Sequenz einer Satelliten-DNA bestimmen läßt. Diese Sequenz stellt eine Prototypsequenz der 370 bp Einheit dar; sie repräsentiert die Abfolge der häufigsten Basen in jeder Position der repetitiven Einheit. Die Prototypsequenz wurde durch die komplette Sequenzierung beider DNA-Stränge ermittelt.

Die 370 bp Sequenz läßt sich in vier 92/93 bp Einheiten unterteilen. Diese Einheiten definieren eine 93 bp Prototypsequenz. Die Divergenz der vier 92/93 bp Einheiten von dieser Prototypsequenz beträgt 19 %.

An definierten Positionen der 370 bp Einheiten wurden kleinere Anteile abweichender Nukleotide gefunden, was auf die Existenz unterschiedlicher Segmente hinweist. Diese Segmente innerhalb der Satelliten-DNA setzen sich aus verschiedenen Kopien der 370 bp Einheit zusammen.

Das durch die Sequenzierung gefundene Methylierungsmuster der Satelliten-DNA steht im Einklang mit der beobachteten unterschiedlichen Spaltbarkeit verschiedener Erkennungssequenzen durch die Restriktionsnukleasen Eco RI und Hinf I.

Beim Vergleich der Sequenz der Satelliten-DNA I mit der Sequenz der Satelliten-DNA der Maus wurde eine Homologie von 48 % gefunden. Geringere Homologien bestehen zu Satelliten-DNAs aus *Drosophila melanogaster*, dem Rind, der grünen Meerkatze und dem Menschen.

Die Ergebnisse aus der Sequenzanalyse ermöglichten zusammen mit Erkenntnissen aus Restriktionsnukleasespaltungen, ein einfaches Modell für die Evolution der Satelliten-DNA aufzustellen.

c. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bonner, J., Garrard, W.T., Gottesfeld, J., Holmes, D.S., Sevall, J.S., und Wilkes, M., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 303-310 (1973)
2. Botchan, M., McKenna, G., und Sharp, P.A., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 383-395 (1973)
3. Britten, R.J., und Kohne, D.E., Science 161, 529-540 (1968)
4. Brutlag, D., Carlson, M., Fry, K., und Hsieh, T.S., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 1137-1146 (1978)
5. Brutlag, D., Ann. Rev. Genet., in Druck
6. De Filippes, F.M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 586-596 (1974)
7. Doskocil, J., und Sorm, F., Biochem. Biophys. Acta 55, 953-959 (1962)
8. Fry, K., und Salser, W., Cell 12, 1069-1084 (1977)
9. Fuke, M., und Busch, H., FEBS Lett. 99, 136-140 (1979)
10. Fuke, M., Davis, F.M., und Busch, H., FEBS Lett. 102, 46-50 (1979)
11. Gray, C.P., Sommer, R., Polke, C., Beck, E., und Schaller, H., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 50-53 (1978)

12. Greene, P.J., Betlach, M.C., Boyer, H.W., und Goodman, H.M., *Methods Mol. Biol.* 7, 87-111 (1974)
13. Hatch, F.T., Bodner, A.J., Mazrimas, J.A., und Moore, II, P.H., *Chromosoma* 58, 155-168 (1976)
14. Hörz, W., und Altenburger, W., *Nucl. Acids Res.* 9, 683-696 (1981)
15. Hörz, W., und Zachau, H.G., *Eur. J. Biochem.* 73, 383-392 (1977)
16. Igo-Kemenes, T., Greil, W., und Zachau, H.G., *Nucl. Acids Res.* 4, 3387-3400 (1977)
17. Kit, S., *J. Mol. Biol.* 3, 711-716 (1961)
18. Kurnit, D.M., *Human Genet.* 47, 169-186 (1979)
19. Mann, M.B., und Smith, H.O., *Nucl. Acids Res.* 4, 4211-4221 (1977)
20. Manuelidis, L., und Wu, J.C., *Nature* 276, 92-94 (1978)
21. Maxam, A.M., und Gilbert, W., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 560-564 (1977)
22. Maxam, A.M., und Gilbert, W., *Methods in Enzymology*, Vol. 65 (Hrsg.: Grossman, L., und Moldave, K.), 499-560, Academic Press, New York (1980)
23. Mc Conaughy, B., und Mc Carthy, B.J., *Biochem. Genet.* 4, 425-446 (1970)

24. Ohmori, H., Tomizawa, J., und Maxam, A.M., Nucl. Acids Res. 5, 1479-1485 (1978)
25. Peacock, A.C., und Dingman, C.W., Biochemistry 6, 1818-1827 (1967)
26. Pech, M., Streeck, R.E., und Zachau, H.G., Cell 18, 883-893 (1979)
27. Pech, M., Igo-Kemenes, T., Zachau, H.G., Nucl. Acids Res. 7, 417-432 (1979)
28. Rosenberg, H., Singer, M., und Rosenberg, M., Science 200, 394-402 (1978)
29. Russell, G.J., Walker, P.M.B., Elton, R.A., und Subak-Sharpe, J.H., J. Mol. Biol. 108, 1-23 (1976)
30. Setlow, P., in: Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd Edition, Nucl. Acids Vol. II (Hrsg.: Fasman, G.D.), 312-318, CRC Press Cleveland (1975)
31. Shmookler-Reis, R.J., und Biro, P.A., J. Mol. Biol. 121, 357-374 (1978)
32. Smith, G.P., Science 191, 528-535 (1976)
33. Smith, H.O., und Nathans, D., J. Mol. Biol. 81, 419-423 (1973)
34. Sober, H.A. (Hrsg.), in: Handbook of Biochemistry, H-97, CRC Press Cleveland (1970)

35. Southern, E.M., J. Mol. Biol. 94, 51-69 (1975)
36. Southern, E.M., und Roizés, G., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 429-433 (1973)
37. Streeck, R.E., und Zachau, H.G., Eur. J. Biochem. 89, 267-279 (1978)
38. Sussenbach, J.S., Monfoort, C.H., Schiphof, R., und Stobberingh, E.E., Nucl. Acids Res. 3, 3193-3202 (1976)
39. Sussenbach, J.S., Steenbergh, P.H., Rost, J.A., van Leeuwen, W.J., und van Emlden, J.D.A., Nucl. Acids Res. 5, 1153-1163 (1978)
40. Tanaka, T., und Weisblum, B., J. Bacteriol. 121, 354-362 (1975)
41. Vanyushin, B.F., Tkacheva, S.G., und Belozersky, A.N., Nature 225, 948-949 (1970)
42. Wagner, R.E., und Radman, M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3619-3622 (1975)
43. Walker, P.M.B., Nature 229, 306-308 (1971)

7.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
Ref.	Referenz

Die Bezeichnungen der Restriktionsnukleasen entsprechen den in Ref. 33 angegebenen Empfehlungen. Alle anderen Abkürzungen richten sich nach den Empfehlungen der "IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature", wie sie dargelegt sind in:

"Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents", Eur. J. Biochem. 15, 203-208 (1970)

und

"Abbreviations and Symbols", Eur. J. Biochem. 74, 1-6 (1977).

LEBENS LAUF

Am 4. November 1952 wurde ich in Heidenheim, Baden-Württemberg, geboren. Im Anschluß an die Volksschule in Königsbronn besuchte ich das Hellenstein-Gymnasium in Heidenheim. Im Jahr 1967 wechselte ich auf das Chiemgau-Gymnasium in Traunstein, Bayern, über, wo ich 1971 die Reifeprüfung ablegte. Nach Ableistung des Grundwehrdienstes begann ich im November 1972 das Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach der Vordiplomprüfung studierte ich ein Jahr an der "University of Edinburgh" Mikrobiologie, Molekularbiologie und Zoologie. Ich legte die "Degree Examinations" ab und setzte mein Studium an der Universität München fort. Seit dem Sommersemester 1976 studierte ich Biologie und Humanmedizin. Das Studium der Biologie schloß ich 1977 nach den Diplomhauptprüfungen mit einer Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. H.G. Zachau ab; anschließend fertigte ich eine Doktorarbeit für den Fachbereich Biologie an, die 1980 zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Biologie führte. Das Studium der Medizin beendete ich 1983 mit dem letzten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Die vorliegende Dissertation entstand 1979 unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. H.G. Zachau im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig
angefertigt und keine anderen als die angegebenen
Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

München, den 12. April 1982

